

MEMO

aan : to

PTG - bibliotheek

van : from

CABO - bibliotheek



cabo-dlo

ons kenmerk / our reference

doorkiesnummer / direct line

bijlagen / enclosure

datum / date

15/4'92

onderwerp / subject

- ☐ n.a.v. uw verzoek / as requested
- ☐ ter kennisneming / for information
- ☐ voor verdere behandeling / for your attention
- ☐ t.b.v. bespreking / for discussion
- ☐ gaarne commentaar voor / for comment before
- ☐ de stukken kunt u behouden / these documents may be kept
- ☒ de stukken moeten teruggezonden worden / the documents must be returned *(dit verslag is te leen)*
- ☐ met dank voor inzage / documents are returned. Thank you for the information

Centrum voor
Agrobiologisch
Onderzoek (CABO-DLO)
Bornsesteeg 65
Postbus 14
6700 AA Wageningen
Telefoon: 08370 - 7 57 00
Telefax: 08370 - 2 31 10
Telex: 75209 cabo nl
e-mail: pri@cabo.agro.nl

Bibliotheek CABO-DLO
Bornsesteeg 65
Postbus 14
6700 AA Wageningen
W. de Bie



cabo-dlo

290393

J.H. Venekamp
"Op de scheiding van wegen",
een fysiologische beschouwing
over een plant in nood.

bij mijn afscheid van het CABO
3 juni 1988

Ter nagedachtenis
aan mijn leermeester
Prof.dr. A.W.H. van Herk

Inhoud

blz.

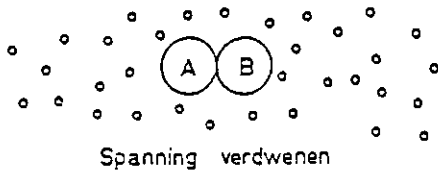
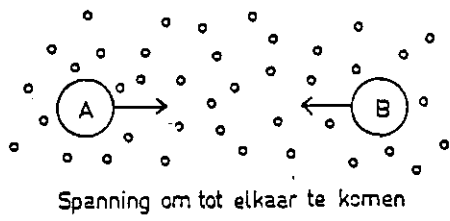
1. Waterpotentiaal	3
2. Vrij en gebonden water	5
3. Belangrijke wegen in de stofwisseling	7
4. Fotosynthese en ademhaling	7
5. De scheiding van wegen in de stofwisseling	11
6. Organische zuren	13
7. Proline	15
8. Organische zuren en proline	17
9. Betekenis van glutaminezuur-dehydrogenase	19
10. pH-regulatie	21
11. Veredeling op droogte-resistentie	23
12. Binding van ammonium-ionen bij lichtgebrek	23
13. Binding van ammonium-ionen bij watergebrek	27
14. Te weinig of te veel stikstof	27
15. Verhouding stikstof en fosfor	29
16. Temperatuur	29
17. Pathogenen	29
18. Niet-natuurlijke omstandigheden	31
19. Evenwicht tussen stofwisselingssystemen	33
20. Het voortbestaan van planten	33

Samenvatting

Een tekort aan water veroorzaakt zodanige veranderingen in de waterhuishouding van de plant dat de fotosynthese het meest wordt geremd. Van geringere betekenis is de remming van de activiteit van het fotorespiratoire ademhalingssysteem. Stimulering van de oxydatieve ademhaling leidt zelfs tot een toename van de hoeveelheid van de bij dit systeem betrokken organische zuren. Uitdroging verhoogt de concentratie van deze zuren extra. De hoeveelheid organische zuren die in de fotorespiratoire ademhaling functioneren, neemt af. Toch kan de dehydratie zo sterk zijn dat de concentratie van deze zuren zelfs hoger is dan bij normale omstandigheden van watervoorziening. De ontstane overmaat aan waterstofionen wordt onschadelijk gemaakt door reacties via dehydrogenasen waarbij NADPH wordt geoxydeerd tot NADP^+ . Als gevolg hiervan ontstaan proline en in mindere mate asparagine.

Een tekort aan licht kan de fotosynthese zodanig beperken dat, behalve de koolhydraatvoorraden, ook eiwitten worden verademd. Vorming van glutamine en vooral van asparagine via het systeem van glutaminesynthetase en glutaminezuursynthase maakt de ontstane overmaat aan ammonium-ionen onschadelijk voor de plant.

Reacties op andere gebreken zijn herleid tot het grondpatroon van een verschuiving van het evenwicht tussen fotosynthese en ademhaling waarbij "op de scheiding van deze stofwisselingswegen" proline en/of asparagine kunnen ontstaan.



1

Chemische potentiaal

$$\mu_j = \mu_j^* + RT \ln a_j + \bar{V}_j P + z_j F E + m_j g h$$

1
2
3
4
5

kinetische energie
concentratiefactor
electrische lading
potentiële energie

constante

2

Chemische potentiaal voor water

$$\mu_w = \mu_0 + RT \ln a_w + \bar{V}_w P + m_w g h$$

kinetische energie
potentiële energie

volume
spanning (druk)

hiervan afgeleid:

zuigkracht = waterpotentiaal

een sterk negatieve waterpotentiaal
wijst op watertekort

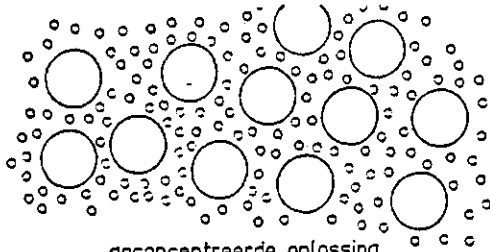
3

1. Waterpotentiaal

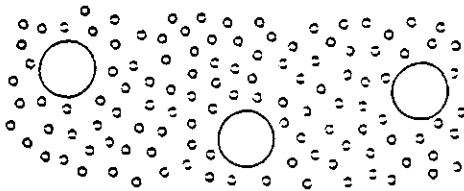
Voor de levensfuncties is water absoluut noodzakelijk. Van elk levend wezen is water ook verreweg het grootste bestanddeel; meer dan de helft van het gewicht van een organisme is water. Afgezien van hydrolyse-reacties, is de deelname van water aan de stofwisseling van een andere aard als die van bestanddelen, zoals suikers, aminozuren e.d. De verschijnselen die van dit water kunnen worden beschreven, worden in de fysiologie dan ook als een apart onderdeel behandeld. Ze staan bekend als de waterhuishouding of "water state" van het organisme; in ons geval betreft dit het water in de plant.

Voor de stofwisseling is het kenmerkend dat alle reacties zich in waterig milieu afspelen; het tot elkaar komen van reactieve deeltjes, het splitsen van componenten of meer in het algemeen de omzettingen van het ene bestanddeel in het andere, vinden in water plaats. De deeltjes die met elkaar gaan reageren, moeten tot elkaar komen (1). Ten opzichte van elkaar bezitten zulke deeltjes een hoeveelheid energie die bepalend is voor de neiging om tot reactie te komen.

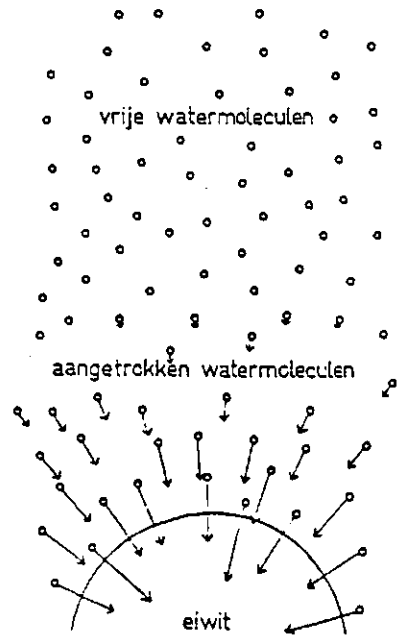
Deze neiging wordt beschreven door de formule van de chemische potentiaal (2); een potentiaal begrepen als een grootheid die in elk punt van het systeem de spanning of energie tot chemische binding aangeeft. In de formule komen vijf termen voor. De eerste term is een constante; die de omrekening van de andere termen tot een geheel mogelijk maakt. De tweede term geeft de kinetische of bewegingsenergie aan, dus de neiging om te reageren en tot chemische binding te komen. De derde term wijst op de bijdrage aan de reactie van andere gelijksoortige deeltjes in de directe omgeving; de concentratie dus. De vierde term duidt op de invloed van de elektrische lading en de vijfde term geeft een aanwijzing van de potentiële energie, dus de invloed van de onderlinge afstand van de reagerende deeltjes. Al deze grootheden dragen bij aan het tot stand komen van de reactie tussen A en B (1) (Nobel, 1974). Hierbij wordt ervan uitgegaan dat geen andere stoffen in het reactiesysteem voorkomen dan alleen het oplosmiddel, dus het water. Maar ook voor de waterdeeltjes geldt zo'n formule als de chemische potentiaal, waarin nu de vierde term betreffende de elektrische lading ontbreekt (3). Belangrijk is hier de tweede term betreffende de kinetische energie, die een maat is voor de beweeglijkheid van de waterdeeltjes en volgens definitie de osmotische potentiaal bepaalt (Boyer, 1969). Van deze potentiaal is tenslotte de waterpotentiaal afgeleid, zoals die in de plantenfysiologie wordt gebruikt (Vos, 1986). Het is hier niet de gelegenheid om deze afleidingen in details uit te werken. Waar het om gaat, is dat in de formulering van de waterpotentiaal alle vormen van energie verwerkt zijn die de beweeglijkheid van de watermoleculen beheersen. Daalt de waterpotentiaal door



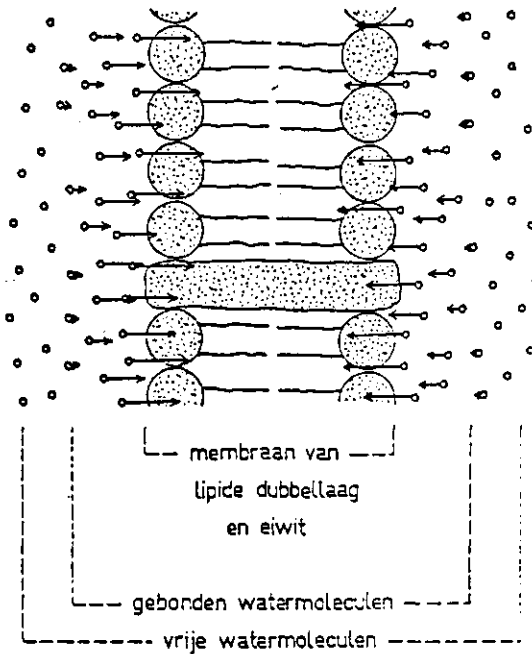
geconcentreerde oplossing
beweeglijkheid belemmerd



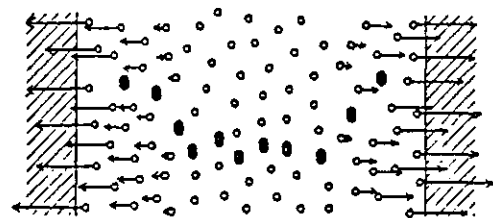
verdunde oplossing
beweeglijkheid onbelemmerd



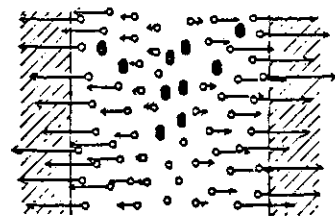
5



6



voldoende water aanwezig
geringe weerstand



tekort aan water
grote weerstand

7

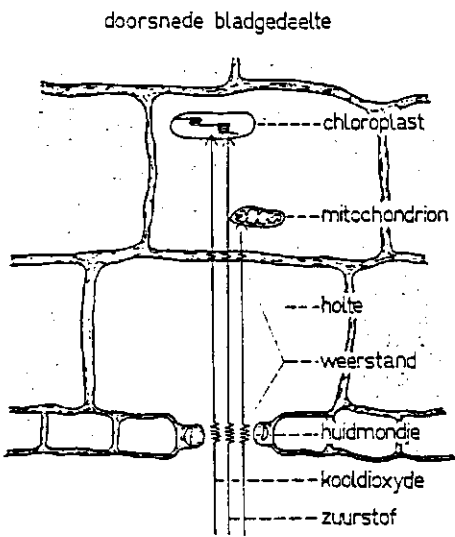
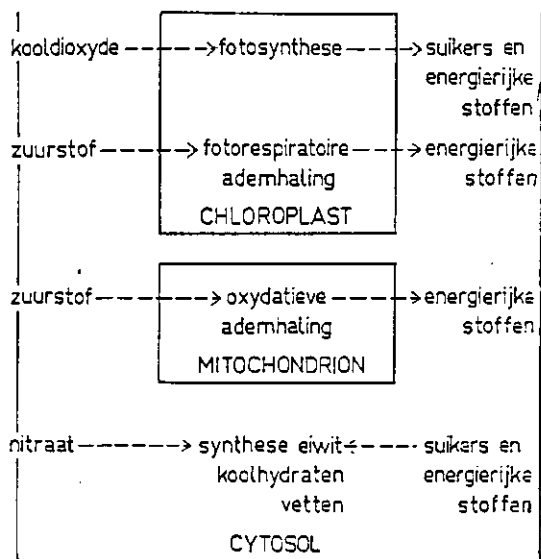
uitdrogen, dan zal, zolang de plant kan blijven functioneren, een aanzuigende kracht op het water uit de omgeving worden ontwikkeld. Hoe sterker negatief die waterpotentiaal is, hoe sterkere aanzuigende werking gaat ontstaan. Daling van waterpotentiaal heeft tot gevolg dat het volume van de plant afneemt; de vacuolen nemen een geringer volume in. Is de waterpotentiaal te ver gedaald, dan schrompelen het cytosol, de chloroplasten, mitochondriën e.d. ineen. De bestanddelen die in de vacuolen en het cytosolwater voorkomen, zijn niet meer vrij beweeglijk. De omstandigheden die in zo'n plant heersen (Vertucci en Leopold, 1987), wijken sterk af van die waarbij de bestanddelen onafhankelijk van elkaar kunnen bewegen, zoals in de bekende relaties van Van't Hoff wordt beschreven. Deze beide situaties zijn de grenzen die de reacties van planten bij watertekort bepalen (4).

2. Vrij en gebonden water

In de cellen komen de eiwitten die meestal als enzymen functioneren, niet als eenvoudige oplossingen van onafhankelijke deeltjes in water voor. Rondom elk vrij in het cytosol voorkomend eiwitdeeltje of een ander macromolecule komen watermoleculen voor die door het eiwit worden aangetrokken; hoe dichterbij het eiwit, hoe sterker de aantrekking (5).

Eiwitten kunnen ook in membranen voorkomen en zijn dan met de hydrofiele kant naar het cytosol gekeerd en met de hydrofobe kant naar het inwendige van het membraan (6), waar water niet kan komen. Ook hier treft men een waterlaag aan die een binding heeft met het membraan. Deze verschijnselen maken dat niet alle watermoleculen in het cytosol of binnen de celcompartimenten, zoals chloroplasten en mitochondriën, vrij beweeglijk zijn. Transport van stoffen die in het metabolisme worden omgezet, zal in het vrije water vrijwel ongehinderd kunnen plaatsvinden. In de buurt van macromoleculen zal transport van zulke stoffen gehinderd worden door de geringe beweeglijkheid van de watermoleculen.

Daar heerst een zekere starheid en die wordt in de buurt van een enzyme-oppervlak alleen doorbroken door substraatdeeltjes. De chemische activiteiten van enzyme en substraat werken als een extra attractiekracht. Tijdens droogte zal in de eerste plaats het vrije water uit de plant verdwijnen; immers dit water wordt niet vastgehouden door de aantrekkende werking van macromoleculen. Het gevolg is dat verplaatsing van metaboliëten, stofwisselingsprodukten, wordt bemoeilijkt; de doorgang door vrij water is vernauwd, m.a.w. de weerstand ten aanzien van transport neemt toe (7). We kunnen een vergelijking maken met begrippen die in de elektriciteitsleer worden gebruikt. Immers daar is de elektrische weerstand omgekeerd evenredig met de doorsnede van de draad en volgens de Wet van Ohm neemt de stroomsterkte bij constante spanning af,



wanneer de weerstand toeneemt. In analogie hiermee wordt het duidelijk dat de stofwisselingssnelheid zal afnemen zodra de intracellulaire weerstand groter wordt.

Zolang uitdrogen van de plant niet verder gaat dan verdwijnen van vrij water, zal herstel na opnieuw beschikbaar komen van water uit het milieu mogelijk zijn. Gaat de uitdroging verder, zodat ook aan macromoleculen gebonden water begint te verdwijnen, dan treden geleidelijk beschadigingen op; membranen versmelten en zullen niet meer van elkaar loskomen en eiwitten beginnen te denatureren; een onherstelbare verandering in de structuur treedt op.

3. Belangrijke wegen in de stofwisseling

Vele macromoleculen, zoals de eiwitten, vormen de machinerie waarmee een plant in de stofwisseling werkt; hiermee functioneert een plant. We kennen een aantal hoofdprocessen, die in heel bepaalde celcompartimenten voorkomen (8). In de chloroplasten vinden we het systeem van de fotosynthese dat het kooldioxyde uit de lucht tot suikers bindt en waaruit energierijke stoffen vrijkomen. Aan dit proces is de zgn. fotorespiratoire ademhaling gekoppeld; hier worden met behulp van zuurstof uit de lucht organische stoffen, uiteindelijk afkomstig van de fotosynthese, afgebroken om energierijke stoffen op te bouwen. Datzelfde gebeurt in het systeem van de oxydatieve ademhaling dat in de mitochondriën voorkomt. Energierijke stoffen worden gebruikt voor de opbouw van hoogmoleculaire componenten, zoals RNA, DNA, eiwitten, koolhydraten en vetten; stoffen die nodig zijn voor de structuur, de habitus en het functioneren van de plant.

4. Fotosynthese en ademhaling

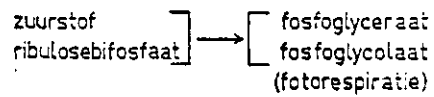
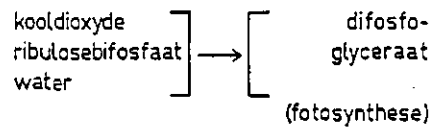
De snelheid waarmee de metabolische omzettingen plaatsvinden, wordt niet overal in dezelfde mate door uitdroging verminderd. Het transport van substraat-deeltjes wordt o.a. bepaald door de deeltjesgrootte, de structuur van het deeltje, de oplosbaarheid in water en de aanwezige hoeveelheid of concentratie (9). In de literatuur komt steeds naar voren dat het fotosyntheseprocess in planten met een tekort aan water meer geremd is dan bijvoorbeeld de ademhaling. Hoewel de toevoer van kooldioxyde onmiddellijk stagneert zodra de huidmondjes zich sluiten (Begg en Turner, 1976), wordt de niet door stomata gecontroleerde fotosynthese sterker geremd dan de ademhaling (Gupta en Berkowitz, 1987). Dit kan gebeuren doordat de inter- en intracellulaire aanvoer van kooldioxyde naar het fotosynthesesysteem zo'n grote weerstand ondervindt door indikking van cytosol en van de vloeistof binnen de chloroplasten; deze opvatting wordt gesteund door metingen van het celvolume (Gupta en Berkowitz, 1987). In de

Invloed watergebrek op fotosynthese

- Aktiviteit daalt door :
- 1 sluiting huidmondjes
 - 2 inwendige verhoging weerstand
 - 3 pH-verlaging
 - 4 beschadiging

10

Reacties via ribulosebifosfaat carboxylase/oxygenase



11

Invloed van droogte

Fotosynthese het sterkst geremd

Fotorespiratoire ademhaling geremd

Oxydatieve ademhaling gestimuleerd

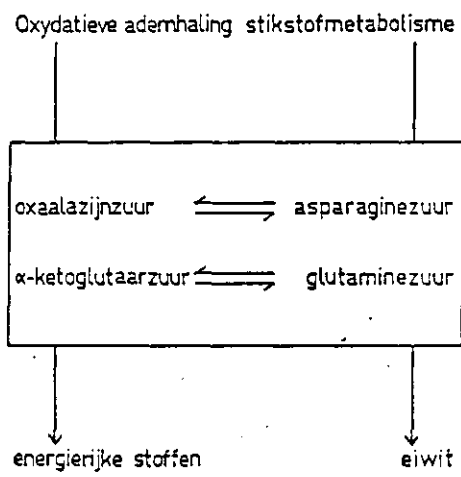
12

celcompartimenten treedt voorts een verhoging van de concentratie van organische zuren op en een pH-verlaging is het gevolg (10). Hierop komen we later terug. Het optimum voor kooldioxydebinding aan ribulose-bifosfaatcarboxylase ligt bij pH 8,1 (Makino et al., 1983) en verhoging van de zuurconcentratie alleen al zou tot sterke verlaging van de enzyme-activiteit kunnen leiden. Beschadiging van het reactiesysteem leidt tot verdere reductie van de enzym-activiteit (Vu et al., 1987), waarbij bovendien het chlorofylniveau sterk verlaagd kan worden (Botha en Botha, 1979 en Sanchez et al., 1983). Ook verschillende andere enzymen van het fotosynthesesysteem gaan in activiteit achteruit (Singal et al., 1985). Deze processen kunnen een snel verloop hebben, veel sneller dan bij veroudering (Dwivedi et al., 1979).

Het zo even genoemde ribulose-bifosfaatcarboxylase is een enzym dat algemeen in groene planten voorkomt. Ellis (1979) berekende dat dit eiwit het meest in de wereld voorkomende eiwit is, nl. 4×10^{13} g of veertig miljoen ton. Het is een bijzonder belangrijk enzym omdat het de kooldioxide-binding in het fotosyntheseproces katalyseert. Het anorganische kooldioxyde is nu in een organische verbinding ingebouwd. Behalve deze binding katalyseert dit eiwit ook een reactie met zuurstof (11). Hierbij ontstaat o.a. fosfoglycolaat, het substraat voor de al eerder genoemde fotorespiratie.

Lawlor en Fock (1975, 1978) vonden dat bij een daling van de waterpotentiaal, dus bij een tekort aan water, de activiteiten van zowel de fotosynthese als van de fotorespiratie dalen, hoewel dit ademhalingssysteem ten opzichte van de fotosynthese enigszins actiever blijft. De aanmaak van suikers door de fotosynthese blijft nu achter bij het verbruik van suikers door de ademhaling. Dit wordt nog versterkt door het feit dat de activiteit van de oxydatieve ademhaling tijdens het tekort aan water zelfs toeneemt. Reservemateriaal zal dus worden aangesproken (12).

Het afgeven van kooldioxyde via de fotorespiratoire ademhaling neemt af, wanneer de zuurstofconcentratie daalt. Zodra de huidmondjes door de waterstress beginnen te sluiten, wordt dit ademhalingssysteem al om deze redenen geremd. Uitdroging kan zelfs zover gaan dat het fotorespiratoire ademhalingssysteem praktisch niet meer werkt (Kriedemann en Downton, 1981). Evenwel vonden Begg en Turner (1976) dat behalve het sluiten van de huidmondjes ook de afname van de te verademen substraten uit de fotosynthese een rol in de remming van de fotorespiratie spelen. Er treedt uiteindelijk een situatie op, dat praktisch alle kooldioxide die in een blad vrijkomt, afkomstig is van de oxydatieve ademhaling. Hierbij moet nog worden opgemerkt dat deze oxydatieve ademhaling pas geremd wordt, wanneer de zuurstofspanning binnen het blad tot beneden 2% van de atmosferische zuurstofspanning is gedaald. Sluiting van huidmondjes door



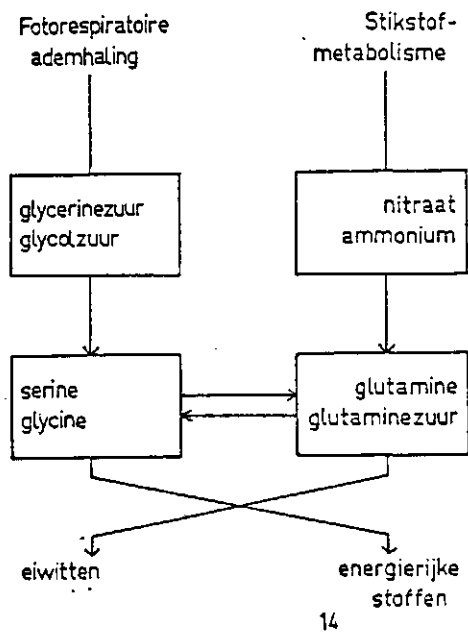
droogte leidt niet tot zo'n drastische verlaging van de zuurstofspanning binnen in het blad, zodat de oxydatieve ademhaling ondanks de sluiting van de huidmondjes minstens ongeremd kan voortgaan.

5. De scheiding van wegen in de stofwisseling

Wij hebben belangrijke stofwisselingssystemen reeds genoemd, zoals fotosynthese, fotorespiratoire ademhaling, oxydatieve ademhaling en stikstofmetabolisme met de daarbij behorende eiwitsynthese. Deze zijn als het ware de grote wegen van de stofwisseling, maar in een bepaald gedeelte van elk systeem komen componenten voor, stofwisselingsprodukten dus, die ook deel uitmaken van een ander systeem. Zo'n component kan in dat systeem in een geheel andere stof worden omgezet als wanneer de component in het eerste systeem wordt verwerkt. We kunnen ons voorstellen alsof de wegen naar een kruispunt leiden. Deze plaats, waar de wegen scheiden, is nu heel belangrijk voor ons betoog betreffende algemene reacties van planten op een tekort aan water, licht, warmte, stikstof enz.

De plaats in de stofwisseling waar de wegen scheiden, wil ik, voordat we verder gaan, nader bekijken (13). De ademhaling is een proces waarbij stoffen met behulp van zuurstof worden afgebroken tot uiteindelijk kooldioxyde en water, en waarbij energierijke stoffen, afgekort als ATP en NADH, ontstaan. Het proces is een oxydatiereactie, waarmee de energie wordt verkregen om levensverrichtingen te vervullen. We hebben al gezien dat planten twee ademhalingsystemen hebben, een fotorespiratoire en een oxydatieve ademhaling. Beide systemen bestaan uit een ingewikkelde serie van aaneengeschakelde reacties waaruit ten slotte de eindprodukten, kooldioxyde, water en energierijke stoffen ontstaan. In deze aaneengeschakelde reacties zijn, behalve een reeks enzymen, ook zuren, organische zuren, betrokken. In de oxydatieve ademhaling komen bijvoorbeeld bekende stoffen als citroenzuur en appelzuur voor, maar ook de voor velen minder bekende zuren, zoals oxaalazijnzuur en α -ketoglutaarzuur. Op de plaats waar de wegen scheiden, zijn het nu vooral deze beide stoffen die zo belangrijk zijn. Zij kunnen in de ademhaling blijven functioneren of zij kunnen onder invloed van een geschikte stikstofbron in de richting van het stikstofmetabolisme worden gestuurd en daar o.a. tot de aminozuren: asparaginezuur en glutaminezuur, worden omgezet.

In het proces van de fotorespiratoire ademhaling zijn ook organische zuren betrokken. Zuren die hier in goed meetbare hoeveelheden voorkomen, zijn glycolzuur en glycerinezuur. In de kooldioxydeproduktie volgens deze ademhalingsweg zijn bovendien twee stikstofbevattende componenten, glycine en serine, betrokken. Dit heeft tot gevolg dat gelijktijdig met kooldioxyde ook ammonium-ionen



Invloed droogte op
organische zuren

Fotorespiratoire ademhaling:

afname hoeveelheid
toename concentratie

Oxydatieve ademhaling:

toename hoeveelheid
grotere toename concentratie

worden geproduceerd. Deze ionen komen echter niet vrij, maar worden opgenomen in het cyclische proces waarbij glutamine en glutaminezuur functioneren (14). De betrokkenheid van ammonium-ionen, glycine, serine, glutamine en glutaminezuur laat ook hier de scheiding van wegen zien, omdat deze stoffen eveneens in het stikstofmetabolisme voorkomen.

Op de scheiding van wegen, waar fotosynthese, fotorespiratoire ademhaling, oxydatieve ademhaling en stikstofmetabolisme elkaar kruisen, vinden we dus een groot aantal stoffen, zoals de genoemde organische zuren en aminozuren, waarmee de plant kan reageren wanneer aan één of meer levensvoorwaarden nauwelijks of in mindere mate is voldaan. Gebeurt dit niet dan verkeert de plant in nood.

6. Organische zuren

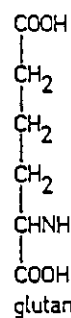
We keren weer terug naar de reacties die in een plant optreden als gevolg van een tekort aan water. We hebben reeds gezien dat de activiteit van de fotorespiratoire ademhaling afneemt. In overeenstemming hiermee nemen hoeveelheden van die organische zuren af, die direct betrokken zijn in het fotorespiratoire systeem. In verband met droogteverschijnselen zijn vooral glycolzuur en glycerinezuur onderzocht. Volgens Goyal (1987) werd de hoeveelheid glycolzuur in de bladeren van rijstzaailingen als gevolg van een watertekort sterk gereduceerd. Eigen onderzoek met veldboneplanten (Venekamp et al., 1988) bracht aan het licht dat de totale hoeveelheid glycerinezuur en glycolzuur in één plant afnam zodra de plant gebrek aan water kreeg. Ondanks deze afname namen de concentraties van deze zuren toe doordat de planten reeds veel water hadden verloren (15).

De systemen van de fotosynthese en van de fotorespiratie bevinden zich in de chloroplasten. Deze hebben de groene kleur vanwege het voor de fotosynthese zo belangrijke chlorofyl. Andere compartimenten, zoals de mitochondriën, zijn celonderdelen die het systeem van de oxydatieve ademhaling herbergen. De beide ademhalingsystemen zijn in de plantecellen dus ruimtelijk gescheiden. Dit kan een oorzaak zijn dat een tekort aan water zo'n verschillende invloed heeft op de activiteiten van de ademhalingsystemen. In tegenstelling tot de fotorespiratie neemt de activiteit van de oxydatieve ademhaling bij waterstress toe. Uit eigen waarnemingen (Venekamp et al., 1988) konden we de conclusie trekken dat de zuren die bij dit ademhalingssysteem zijn betrokken, in totale hoeveelheid toenemen. Door indikken van het cytosol is de totale concentratie van deze zuren in verhouding veel meer toegenomen dan die van de zuren van de fotorespiratie. Voor zover het de oxydatieve ademhaling betreft, zijn het vooral citroenzuur en appelzuur die aan deze verhoging van de zuurconcentratie bijdragen. Een bijzonderheid is dat gelijktijdig met deze concentratieverhoging ook

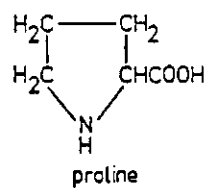
Organische zuren in
constante verhouding

	<u>oud blad</u>	<u>jong blad</u>
citroenzuur	34	70
appelzuur	12	9
melkzuur	54	21

16



kenmerkend
voor alle
aminozuren
glutaminezuur



proline

de concentratie van melkzuur in dezelfde mate toeneemt. Dit is echter niet zo verwonderlijk als we bedenken dat de vorming van melkzuur bij planten in dezelfde compartimenten, de mitochondriën, plaatsvindt als waar citroenzuur en appelzuur in de oxydatieve ademhaling functioneren.

In ons eigen onderzoek met veldboneplanten bleek de verhouding van de concentratie van elk van deze zuren tot de totale zuurconcentratie constant te zijn (16). Zelfs gedurende een periode van een ernstig watertekort blijft de verhouding gehandhaafd. Blijkbaar functioneren zulke zuren als een eenheid binnen het ademhalingsstelsel.

De localisatie van de oxydatieve ademhaling in de mitochondriën betreft vooral de bij dit stelsel betrokken enzymen. Deze vormen de lamellen binnen het celcompartiment. De organische zuren echter zijn niet op een dergelijke wijze ingebouwd dat de beweeglijkheid van deze stoffen beperkt is. De zuren kunnen als het ware vrij in en uit diffunderen en kunnen ook op de eerder beschreven plaats, waar de wegen scheiden, reacties aangaan die onderdeel zijn van andere stofwisselingswegen.

7. Proline

In 1954 ontdekten de Engelse onderzoekers, Kemble en MacPherson (1954) bij toeval een verschijnsel dat optreedt in plantedelen die beginnen te verwelken. In die tijd was in Engeland de ontwikkeling van de aminozuuranalyse met behulp van chromatografie in volle gang en van de resultaten wilden Kemble en MacPherson gebruik maken om de aminozuursamenstelling van grassen te analyseren. Zij hadden nog een hoeveelheid materiaal van *Lolium perenne* op een plank in hun laboratorium liggen. Toen zij de uitkomst van hun chromatografische analyse bekeken, bemerkten zij de grote hoeveelheid proline (17) die in hun materiaal aanwezig was. Het werd hen spoedig duidelijk dat deze hoeveelheid te maken had met het feit dat het gras al een tijd op die plank had gelegen en daardoor een groot gebrek aan water had. De publikatie in de *Biochemical Journal*, die over deze waarneming werd geschreven, was tamelijk onopvallend. Het heeft nog wel enige tientallen jaren geduurd, voordat het verschijnsel de algemene aandacht trok. Toen kwam een ware lawine los van publikaties waarin werd beschreven hoe in plantedelen, vooral in bladeren, proline accumuleerde zodra de waterpotentiaal begon te dalen en de plant waterstress kreeg. Een dertig- tot vijftigvoudige toename in de prolineconcentratie ten opzichte van wat normaal in de plant voorkomt, werd veelvuldig gemeld. Verklaringen voor het verschijnsel bleven natuurlijk niet uit. Zo zou het proline zoveel energie bevatten dat het de plant in staat zou stellen om weer op gang te komen met de fotosynthese, met groeien en met zaadontwikkeling bij opnieuw toedienen van

processen bij water-tekort

1^{ste} dag

stikstofmetabolisme:

eiwitafbraak → aminozuren → → proline
(en asparagine)

2^{de} dag

stikstofmetabolisme:

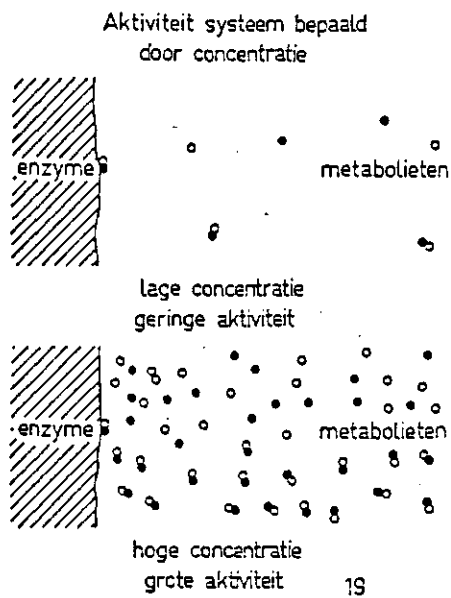
eiwitafbraak → aminozuren → → proline
oxydatieve ademhaling ↑ (en asparagine)
organische zuren → ← ammoniumionen

water. Ook zou het proline als een osmoticum dienen, waarmee te vergaande uitdroging kon worden tegengegaan. Anderen menen dat de verhoogde prolineconcentratie tot betere bescherming van eiwitten leidt onder de omstandigheden van uitdroging.

In al deze beschouwingen schuilen vele waarheden, maar echte verklaringen voor het ontstaan van zo'n proline-accumulatie zijn ze niet. Zo'n verklaring bleef gewenst want men kon toch moeilijk om dit verschijnsel heen. Het treedt té duidelijk op en is bovendien van té algemene aard. Iedere plant die te lijden heeft van een watertekort, zal proline maken en accumuleren. Hoewel proline geen echt aminozuur is, maar zich metabolisch wel als zodanig gedraagt, was het voor ons een goede reden om in proefplanten, veldbonen, de relatie van de prolinessynthese tot de veranderingen in de hoeveelheden van andere aminozuren bij waterstress na te gaan (Venekamp en Koot, 1988). In de natuur en dus ook in planten, zijn minstens 20 verschillende aminozuren bekend, die zowel in vrije vorm als gebonden in eiwit, voorkomen. Ons onderzoek strekte zich tot beide groepen van aminozuren uit. Concentraties van deze in de samenstellende delen van de plant werden op het moment van droogzetten en vervolgens respectievelijk 1 dag en 2 dagen nadien gemeten. Berekeningen leerden dat de toename van het proline gedurende de eerste dag van het droogzetten verklaard kon worden uit omzettingen van aminozuren die door afbraak van eiwit beschikbaar kwamen (18). Gedurende de tweede dag was het beschikbaar komen van aminozuren uit eiwit verreweg ontoereikend om de proline ophoping van deze dag te verklaren. Het teveel aan proline moest afkomstig zijn uit de omzettingen van organische zuren met ammonium-ionen; dus uit reacties op de plaats waar de stofwisselingswegen scheiden. Immers de eiwitafbraak is onderdeel van de weg van het stikstofmetabolisme, waarbij nu de bouwstenen van het eiwit, de 20 verschillende aminozuren dus, vrijkomen en die uiteindelijk alle in glutaminezuur worden omgezet dat op zijn beurt de uitgangsstof voor proline is. De organische zuren zijn onderdelen van de wegen van de ademhalingsystemen en kunnen met ammonium-ionen ook aanleiding geven tot de vorming van glutaminezuur, dat ten slotte ook in proline wordt omgezet. Hierbij moet worden vermeld dat naast de prolineconcentratie ook die van asparagine in belangrijke mate kan toenemen wanneer de plant gebrek aan water begint te krijgen. Op deze toename kom ik straks terug.

8. Organische zuren en proline

Wij zijn echter weer terug bij de toename van de organische zuren uit de oxydatieve ademhaling en nu moeten we tot een verklaring komen waarom bij droogte juist deze zuren aanleiding geven tot zo'n uitbarsting van proline.



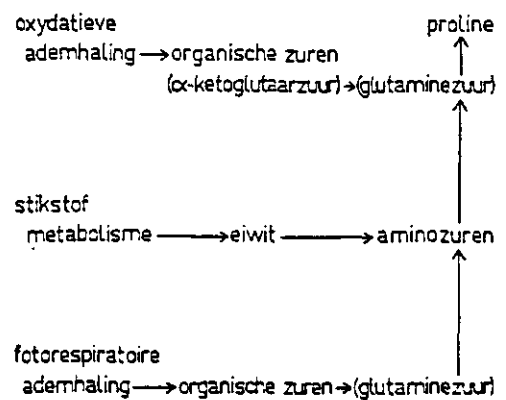
Organische zuren en proline bij veldboon

$\frac{\text{concentratie bij droogte}}{\text{concentratie normaal}} = \text{veelvoud}$

	proline (Pr)	org. zuren oxydatieve ademhaling (Ac ₁)	org. zuren fotorespirat. ademhaling (Ac ₂)
top boven blad 12	6,0	1,6	1,8
bladeren 10-12	8,0	1,9	1,3
bladeren 7-9	3,0	1,5	1,2
bladeren 1-6	1,3	1,3	1,1
stengeldelen 10-12	7,0	1,7	1,2
stengeldelen 7-9	8,0	1,7	1,4
stengeldelen 1-6	6,0	1,6	1,1
wortels	4,0	1,9	1,4

functioneel verband $Ac_1 = 0,1xPr + 1$
20

Ademhaling en proline



Hierbij moet dus de vraag worden gesteld of de activiteit van het metabolisch systeem (19) dat aanleiding geeft tot verhoging van de zuurconcentratie evenredig is met de activiteit van het geheel van enzymen dat de proline synthese beheerst (Venekamp et al., 1988).

De metabolische activiteit wordt voor een heel belangrijk deel bepaald door het aantal deeltjes die zich in de ruimte bevinden waarin de omzetting plaats heeft. Hoe meer deeltjes aanwezig zijn, hoe sneller deze worden omgezet; in ons geval dus, hoe meer zuurmoleculen zich in het blad bevinden, hoe meer proline wordt gevormd. Om hier de activiteit van deze processen te beoordelen, konden wij het beste de concentratiemetingen doen vanaf het moment dat de planten het water werd onthouden. Op deze wijze hadden we praktisch geen last van de kleine hoeveelheid proline die reeds aanwezig was. Ook de zuurconcentratie was op dat moment zo laag mogelijk. Bovendien was de kans op verzadiging aan reactieproducten tijdens zo'n kortdurende proef heel gering. Deze overwegingen gaven de voorwaarden aan dat de activiteit van het stofwisselingssysteem bepaald werd door het aantal deeltjes of anders gezegd door de concentratie die werd gemeten. Voortgaande in de beschouwing van de prolinevorming in te droge planten, konden we vaststellen dat zowel de prolineconcentratie als de organische zuurconcentratie in planten onder waterstress veelvouden waren van de beide corresponderende concentraties in planten onder normale omstandigheden (20). Uit statistische berekeningen is nu gebleken dat een functionele relatie tussen de veelvouden van prolineconcentraties en de veelvouden van concentraties van die organische zuren bestaat, die functioneren in de oxydatieve ademhaling. De berekeningen leverden de functie $Ac = 0,1 \times Pr \times l$ op, waarin Ac het veelvoud van totaalconcentraties citroenzuur, appelzuur en melkzuur en Pr het veelvoud van prolineconcentraties voorstellen; een correlatiecoëfficiënt van 0,8 werd hiervoor gevonden. Een functionele relatie tussen de zuren van het fotorespiratoire systeem en proline is niet waarschijnlijk omdat de correlatiecoëfficiënt voor deze grootheden 0,5 niet haalde. Daaruit trokken we dan ook de conclusie dat proline-accumulatie een nauw verband heeft met de activiteit van de oxydatieve ademhaling (21); met het fotorespiratoire proces zou slechts een verwijderd verband bestaan. Uit de eerder genoemde zuren van de oxydatieve ademhaling kan gemakkelijk via α -ketoglutaarzuur het glutaminezuur ontstaan, dat als uitgangsstof voor de prolinessynthese kan dienen.

9. Petekenis van glutaminezuur-dehydrogenase

Op de scheiding van wegen vinden we glutaminezuur als één van de belangrijkste onder de aminozuren. Deze kan als uitgangsstof of precursor dienen voor vele andere aminozuren op weg naar de eiwitsynthese. In een toestand van droogte

Vorming van glutaminezuur
uit α -ketoglutaarzuur
en ammoniumionen
via

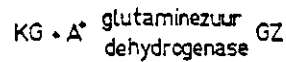
- 1 glutaminesynthetase en
glutaminezuursynthase(chloroplasten)
- 2 glutaminesynthetase en
glutaminezuursynthase(cytosol)
- 3 glutaminezuurdehydrogenase(mitochondriën)

22

Evenwichtsreacties

concentratie α -ketoglutaarzuur is [KG]
concentratie ammoniumionen is [A⁺]
concentratie glutaminezuur is [GZ]

reactie:



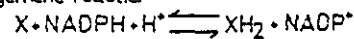
$$K_m\text{-waarde is } \frac{[\text{GZ}]}{[\text{KG}][\text{A}^+]}$$

normaal: hoge K_m -waarde betekent
reactie van rechts naar links
bij droogte: verlaagde K_m -waarde betekent
reactie van links naar rechts

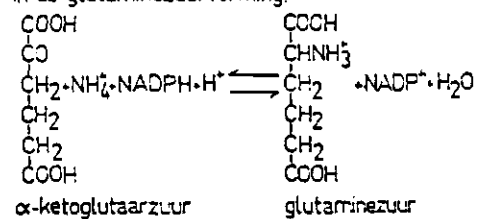
23

Wegname van waterstofionen met
nicotinamide-aderine-
dinucleotidesfaat
(afgekort NADP)

in algemene reactie:



in de glutaminezuurvorming:



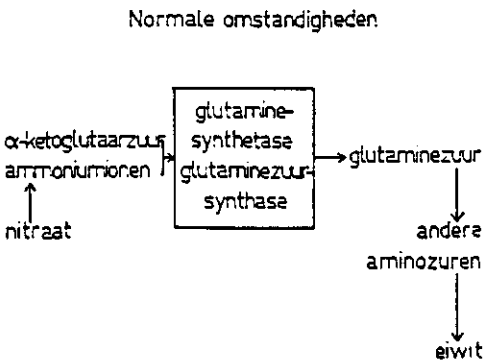
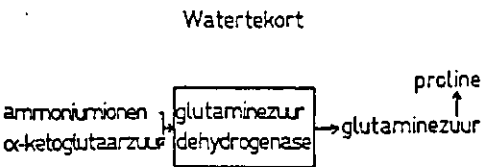
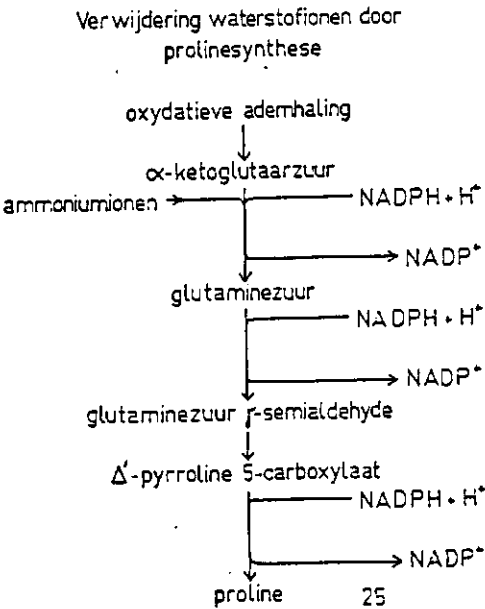
24

komt, zoals we nu weten, de weg van de prolinesynthese sterk naar voren. Dat glutaminezuur kan echter op verschillende manieren tot stand komen (22). Heeft een plant voldoende licht dan wordt glutaminezuur gevormd via glutaminezuursynthase in de chloroplasten (Yamaya en Oaks, 1988). Dit treedt op in verband met glutamineproductie via glutaminesynthetase. Een dergelijk systeem komt ook voor in het cytosol (Avila et al., 1987), waarbij de glutaminezuursynthese waarschijnlijk niet lichtgevoelig is. Echter, wijzen studies met geïsoleerde mitochondriën uit bladeren erop dat ten minste een kleine hoeveelheid ammonium-ionen direct in glutaminezuur via een mitochondriën-glutaminezuur dehydrogenase kan worden geassimileerd (Yamaya et al., 1986). Uit eigen analyses (Venekamp et al., 1988) is gebleken dat proline-accumulatie in bladeren van in donker gehouden veldboneplanten onder waterstress kan optreden. Dit schakelt de lichtgevoelige synthese van glutaminezuur uit, zodat het langs deze weg gevormde glutaminezuur niet als uitgangsstof voor de proline kan dienen.

Bekend is verder dat glutaminezuur dehydrogenase evenals het systeem van de oxydatieve ademhaling in de mitochondriën voorkomt. Derhalve werd dan ook de conclusie getrokken dat glutaminezuur dehydrogenase de schakel vormt tussen de zuren van de oxydatieve ademhaling en de prolinesynthese. Onder normale omstandigheden echter heeft glutaminezuur-dehydrogenase een hoge K_m -waarde voor ammonium-ionen (23) en is daarom geen belangrijk enzym in de ammonium-ionen-assimilatie, die tot vorming van glutaminezuur leidt. Yamaya en Oaks (1987) wezen er echter op dat bepaalde omstandigheden een binding van het enzym aan membranen kan induceren, waarbij gelijktijdig de genoemde K_m -waarde wordt gewijzigd. In ons geval kan de dehydratie, de indikking dus, door wateronthouding de conditie zijn waarbij het enzym aan membranen wordt gehecht en aanleiding geeft tot prolinevorming.

10. pH-regulatie

Nog is niet alles verklaard waarom bij waterstress proline wordt gevormd. Toename in zuurconcentratie heeft een gelijktijdige toename van waterstof-ionen tot gevolg, m.a.w. er treedt een daling in pH op. Een dergelijke inwendige verzuring van de planten als gevolg van droogte, zal op zijn beurt consequenties voor de stofwisselingsactiviteiten hebben. Een regulering van de zuurgraad door middel van ionenuitwisseling via de wortels volgens de beschrijvingen van Dijkshoorn et al. (1968) en van Allen en Raven (1987) is praktisch geheel uitgesloten. Davies (1986) beschreef andere mogelijkheden om de cytosol pH te regelen. De meest belangrijke van de beschreven systemen is de omzetting $X + NADPH + H^+ \rightleftharpoons XH_2 + NADP^+$ die gekatalyseerd wordt door een zgn. dehydrogenerend enzym, zoals bijv. malic enzym, appelzuurdehydrogenase en melkzuur



dehydrogenase (24). De omzetting van α -ketoglutaarzuur in glutaminezuur door glutaminezuur dehydrogenase kan ook een voorbeeld van zo'n reactie zijn en kan daarom bijdragen aan de regeling van het pH-niveau in het celsap. Verwijdering van waterstofionen komt bovendien voor in twee stappen van de metabolische weg van de proline-biosynthese: van glutaminezuur naar glutaminezuur γ -semi-aldehyde en van Δ^1 -pyrroline 5-carboxylaat naar proline (25). Blijkbaar is de prolinesynthese een efficiënt stofwisselingsmechanisme om een overmaat van waterstofionen weg te werken opdat de plant daar zo weinig mogelijk schade van ondervindt. We komen hier dan tot de conclusie dat een tekort aan water een dehydratie veroorzaakt met een verschuiving van het evenwicht tussen fotosynthese en ademhaling zodanig dat een verhoogde zuurconcentratie optreedt waarbij de overmaat aan waterstofionen door proline-accumulatie onschadelijk wordt gemaakt. De plant zal echter in nood verkeren, zodra het systeem van waterstofionen-verwijdering begint te falen.

11. Veredeling op droogte-resistentie

Proline-accumulatie wil men betrekken in het onderzoek, in hoeverre gewassen in staat zijn of zijn te brengen een waterstress te weerstaan. Ideaal zou zijn dat de produktie zoveel mogelijk doorgaat onder zulke omstandigheden van een tekort aan water. Het gaat dus om het veredelen van gewassen op droogteresistentie. Proline-accumulatie zou als criterium kunnen worden gebruikt mits aan bepaalde voorwaarden wordt voldaan. De mate van proline-ophoping is heel verschillend wanneer men met jonge of met oude planten te maken heeft. De temperatuur van de omgeving is ook belangrijk. In samenwerking met Grashoff hebben we een aantal van dergelijke voorwaarden onderzocht (Venekamp et al., 1987a) en deze zouden een basis kunnen zijn voor verder onderzoek in deze materie.

12. Binding van ammonium-ionen bij lichtgebrek

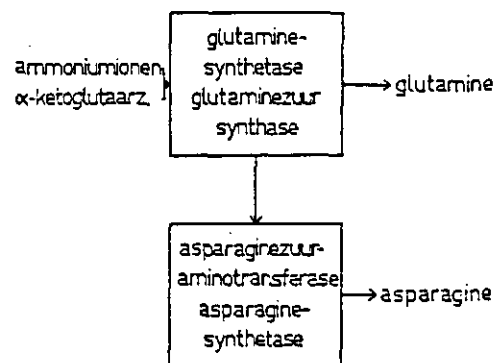
Bij de vorming van proline uit α -ketoglutaarzuur worden ammonium-ionen ingebouwd (26). Onder normale omstandigheden van licht- en watervoorziening is het fotorespiratoire systeem van bijzonder belang in de binding van ammonium-ionen die bij de nitraatreductie tot stand komen. Via het cyclische systeem van glutaminesynthetase en glutaminezuursynthase in de chloroplasten wordt glutaminezuur gevormd dat op de plaats, waar de wegen scheiden, omgezet kan worden in andere aminozuren, die ten slotte in eiwit worden ingebouwd. Zolang het totale systeem in balans is, worden alle uit de nitraatreductie vrijkomende ammonium-ionen steeds in de reactiecyclus betrokken en kunnen de plant niet schaden.

Verwerking van ammoniumionen
met behulp van
de cyclische systemen van

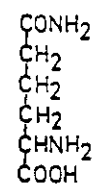
- 1 glutaminesynthetase en glutaminezuursynthase] in chloroplasten
- 2 glutaminesynthetase en glutaminezuursynthase] in cytosol

27

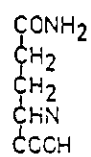
Vorming van
glutamine en asparagine



28



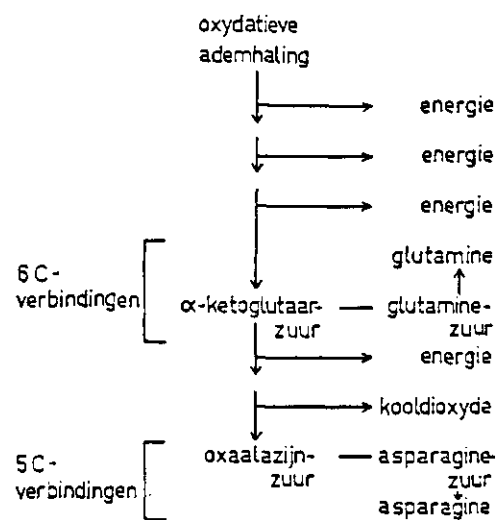
glutamine



asparagine

29

Ademhaling en asparaginevorming



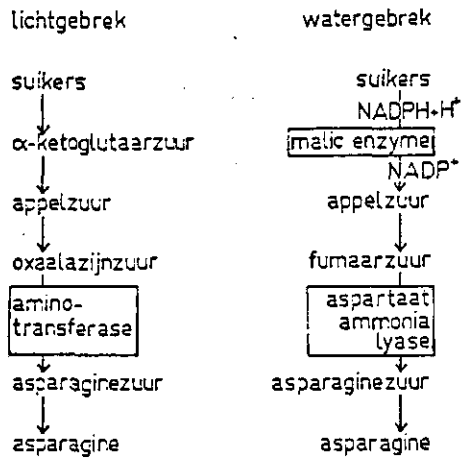
30

Behalve water is het licht een noodzaak van de eerste orde. Bij te weinig licht is de plant onvoldoende in staat om die stoffen te vormen die voor de opbouw van de plant, dus voor de groei, noodzakelijk zijn. Een evenwicht tussen synthese van stoffen voor de opbouw en afbraak van stoffen voor energievoorziening zal wel niet optreden. Onder zulke omstandigheden van lichtgebrek zal zo'n plant blijven groeien ten koste van vroeger gevormde reservestoffen. In de eerste plaats zijn dit koolhydraten, maar wanneer de plant meer in nood komt, zullen ook eiwitten worden afgebroken om de voor de groei van de top noodzakelijke energie te leveren.

Afbraak van eiwitten leidt tot het vrijkomen van de bouwstenen, de aminozuren. Hoe nu de verdere afbraak van die aminozuren plaatsvindt, is niet precies te zeggen. Het uiteindelijke resultaat is dat elk aminozuur in een ammonium-ion en een restmolecule, het zgn. koolstofskelet, wordt gesplitst. De koolstofskeletten worden vervolgens in de ademhalingssystemen opgenomen en verwerkt zodat energierijke stoffen worden opgebouwd, die voor het voortbestaan van de plant het tekort aan lichtenergie moeten vervangen.

De hoeveelheid ammonium-ionen neemt sterk toe (27). Voor zover deze niet in het systeem van glutaminesynthetase en glutaminezuursynthase van de chloroplasten worden opgenomen, zullen de overige ammoniumionen door het gelijknamige systeem van het cytosol (Avila et al., 1987) worden gebonden. Die overmaat ammonium-ionen wordt op zodanige wijze verwerkt dat ten eerste zo weinig mogelijk overblijft en ten tweede de oxydatie van koolstofskeletten zo ver mogelijk doorgaat. In het cytosol komt een serie reacties (28) voor waarbij de ammonium-ionen via het reeds genoemde systeem van glutaminezuur en glutamine en via asparaginezuur aminotransferase en asparagine synthetase worden gebonden in asparagine (Hartmann en Ehmke, 1986). De stikstof van de ammonium-ionen is nu in asparagine gekomen. In tegenstelling tot glutamine heeft asparagine een koolstofskelet met 1C minder (29), voor dit amide kon de oxydatie verder doorgaan dan voor glutamine. Het resultaat van al de reacties (30) in de plant als gevolg van lichtgebrek is de vorming van asparagine waarbij ammonium-ionen onschadelijk zijn gemaakt en de produktie van energierijke stoffen voor de plant zo voordelig mogelijk is (Venekamp, 1955 en Givan, 1979). In dit geval komt de plant werkelijk in nood, wanneer te weinig substraat voor de ademhaling beschikbaar is; dan zijn er niet voldoende stoffen aanwezig waaruit oxaalazijnzuur kan worden gemaakt om de te grote hoeveelheid ammonium-ionen te binden. Een plant kan de overmaat aan ammonium-ionen wegwerken volgens het principe van de massawerking; hoe meer ammonium-ionen aanwezig zijn, hoe meer asparagine wordt gevormd.

Asparaginevorming bij:



31

Betekenis van stikstof en fosfor

Stikstof in :

- aminozuren : bouwstenen van eiwit
- eiwitten : enzymen
- RNA : voor eiwitsynthese
- DNA : voor RNA-synthese

Fosfor in :

- energierijke stoffen : voor synthesesen
- RNA : voor eiwitsynthese
- DNA : voor RNA-synthese

13. Binding van ammonium-ionen bij watergebrek

De reactie van de plant op lichtgebrek is analoog aan die op watergebrek (31). Bij lichtgebrek zijn het de ammonium-ionen en bij watergebrek zijn het de waterstof-ionen die worden verwerkt. Evenwel is het onderscheid niet zo scherp als het nu lijkt, want bij watergebrek hebben we ook een belangrijke toename in de asparagineconcentratie gevonden. De ammonium-ionen die hiervoor nodig waren, kwamen òf uit de eiwitaafbraak, òf uit de voorraad. Het is evenwel zeer goed mogelijk dat deze hoeveelheid asparagine langs een andere weg gevormd kan zijn als asparagine bij lichtgebrek. Via het zgn. "malic enzyme" kan uit de suikers langs een meer directe weg appelzuur worden gevormd dat via aspartaat ammoniolyase ten slotte in asparagine wordt omgezet. Bij de reactie met "malic enzyme" worden ook waterstof-ionen gebonden (Davies, 1986) en wel op dezelfde manier als bij de prolinesynthese. Asparagine dat bij watergebrek wordt gevormd, is dan van een andere oorsprong als het asparagine dat bij lichtgebrek ontstaat.

14. Te weinig of te veel stikstof

Extreme toenames van proline en/of asparagine zijn uiteindelijk gevolgen van veranderingen in de verhouding van fotosynthese en ademhaling. Stikstofgebrek (32) heeft een direct gevolg voor het stikstofmetabolisme. Uit eigen onderzoek werd gevonden dat tijdens de afname van de totale hoeveelheid stikstof de verhouding van de concentratie van oplosbare eiwitten tot de membraaneiwitconcentratie gelijk gebleven was (Venekamp et al., 1985). Onder deze omstandigheid vindt de eiwitsynthese plaats in de groeitop van de plant, waarbij de aminozuren afkomstig zijn uit de eiwitten van oudere, lager gelegen plantedelen (Venekamp en Koot, 1984a). Deze aminozuren worden dus niet verademd en er zal derhalve geen extra hoeveelheid ammonium-ionen worden gevormd. Een toename in asparagine- en/of glutamineconcentratie treedt dan ook niet op.

Het zal duidelijk zijn, dat een teveel aan stikstof (overbemesting!) de plant even goed in nood kan brengen als een tekort aan stikstof. Het meer nitraat of zelfs ammoniak in de grond, hoe hoger de concentratie aan ammonium-ionen in de plant wordt. Om zo'n plant deze ionen te laten verwerken, moeten in ruime mate suikers beschikbaar zijn, die het koolstofskelet voor glutamine en/of asparagine kunnen leveren. Veel licht zal de plant daarbij kunnen helpen om het systeem van de fotosynthese de grootst mogelijke activiteit te geven. Penning de Vries (1982) gaf reeds grenzen aan waarbinnen het stikstofgehalte in een plant mag liggen (Venekamp et al., 1987b).

Te lage temperatuur:
verschijnselen van watertekort

relatieve vermindering fotosynthese
relatieve vermeerdering ademhaling
accumulatie proline en asparagine

Te hoge temperatuur:
verschijnselen van lichttekort

relatieve vermeerdering ademhaling
toename aktiviteit glutaminessynthese-systeem
accumulatie glutamine en asparagine

Verschijnselen van lichttekort,
veroorzaakt door:

Pathogene schimmels:
verlaging fotosynthese-aktiviteit
verhoging ademhalingsaktiviteit
accumulatie asparagine

Virus
verlaging fotosynthese-aktiviteit
(mozaiksympptomen, lokale lesies)
virusvermeerdering m.b.v. eiwitmetabolisme
verhoging ademhalingsaktiviteit
verhoging concentratie organische zuren

15. Verhouding stikstof en fosfor

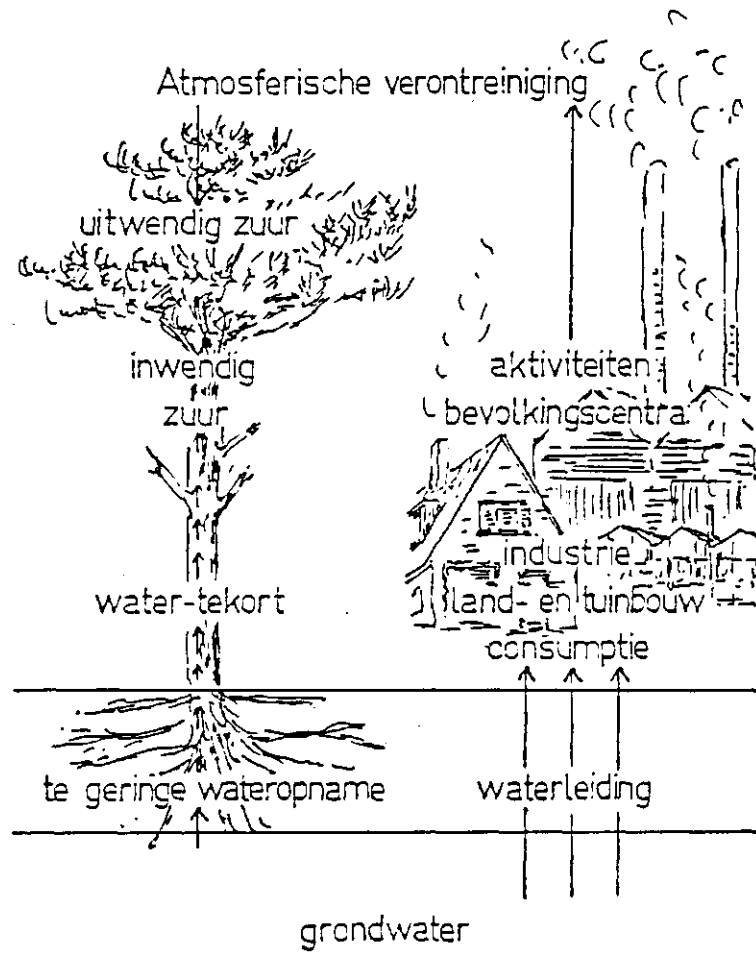
Dijkshoorn en Lampe (1980) vonden een stikstof-fosforverhouding van 10 als de meest gunstige voor een maximale groei. De hoeveelheid stikstof, die een plant kan verwerken, hangt niet alleen van de in de grond beschikbare hoeveelheid stikstof af maar ook van de daarin aanwezige hoeveelheid fosfor. Immers energierijke stoffen bevatten meestal fosfor en de eiwitsynthese vindt plaats onder de invloed van RNA en DNA, waarin fosfor een zeer essentieel bestanddeel is. Gebrek aan fosfor zal dan ook dezelfde invloed op de vrij in de plant voorkomende aminozuren hebben (Venekamp et al., 1986) als een tekort aan stikstof.

16. Temperatuur

Zowel een te hoge als een te lage temperatuur (33) heeft een vermindering van de fotosynthetische activiteit tot gevolg (Caers et al., 1985); de ademhaling neemt relatief in betekenis toe en een verhoging van de asparagineconcentratie is het gevolg (Kuyf en De Voogd van der Straaten, 1984). In een te warme omgeving neemt zelfs de activiteit van de ademhaling en ook die van glutamine synthetase (Tikhomirova, 1985) in absolute zin sterk toe. Proline wordt niet extra gevormd, zolang het celvocht geen water verliest. Dit is echter wel het geval bij extreme koude; het is mogelijk dat water aan het celvocht wordt onttrokken door bevriezing.

17. Pathogenen

Wij hebben gezien dat in al de genoemde vormen van stress een verandering in het evenwicht tussen de drie grote metabolische systemen optreedt: fotosynthese, ademhaling en stikstofmetabolisme. Vanuit deze veranderingen zijn we tot een verklaring gekomen van wat er op de scheiding van wegen in de stofwisseling gebeurt. Vergelijkbare veranderingen treden op als gevolg van de inwerking van pathogenen (34). Een pathogene schimmel consumeert belangrijke stofwisselingsproducten uit de waardplant, waarbij door afscheiding van toxische stoffen enzymen geremd en andere enzymen gestimuleerd worden. Hierbij worden belangrijke onderdelen van het fotosynthesesysteem afgebroken (Farkas, 1964). De waardplant compenseert het verlies aan energie door verhoogde ademhaling waarbij ook hier weer een verhoogde asparagineconcentratie optreedt (Subramanian, 1964 en Sadasivan, 1964). Bij een virusinfectie zien we dikwijls mozaïekstructuren of locale lesies optreden waarbij ook veel van het fotosynthesesysteem wordt afgebroken. In tegenstelling hiermee neemt de ademhaling sterk toe, zodat meer energierijk ATP wordt geleverd (Dwurazna en Weintraub,



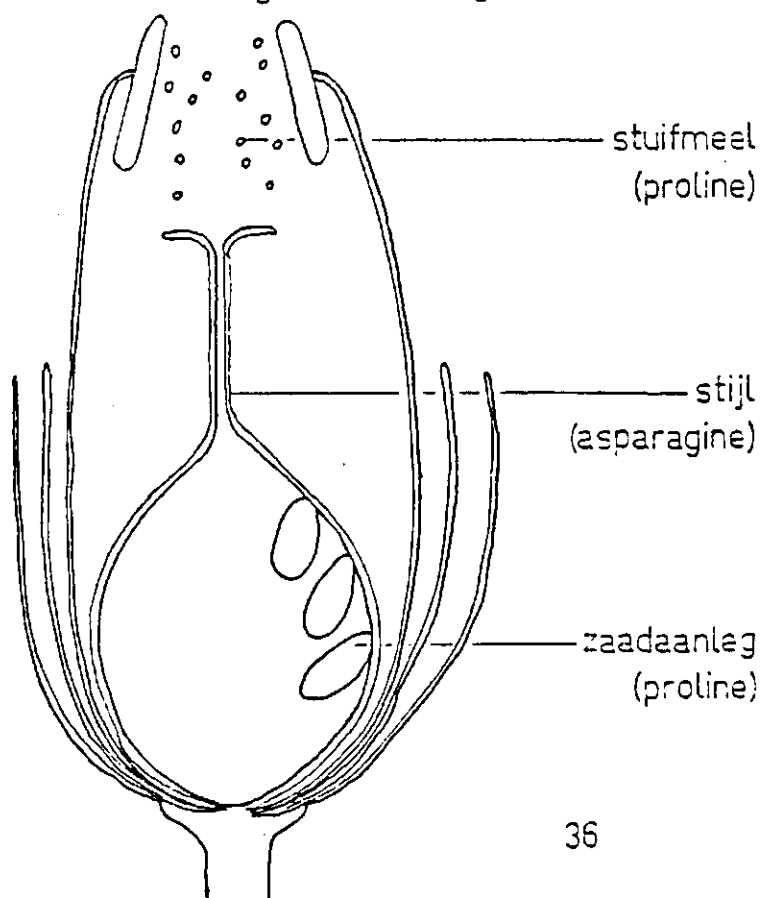
1969a en b). Meestal treedt hierbij een belangrijke toename in de concentratie van de organische zuren op (Venekamp, 1959). Het totale systeem van het stikstofmetabolisme wordt in hoge mate gebruikt voor de vermeerdering van de virusdeeltjes. De activiteit van dat systeem neemt sterk af naarmate de plant begint te verouderen. Daarbij begint ook de mate van virusvermeerdering af te nemen. De hieruit voortkomende ouderdomsresistentie is door ons vooral bij de aardappel uitvoerig onderzocht (Venekamp en Beemster, 1980a en b en Venekamp et al., 1980).

In bepaalde gevallen kunnen pathogenen een directe stress veroorzaken. Aardappelbladrolvirus induceert verstoppingen in de vaten en droogteverschijnselen treden in de plant op. Het gevolg is dan ook een toename in de prolineconcentratie (Perdrizet, 1968). In al de gevallen waar een pathogeen stressverschijnselen oproept, zal de plant direct in nood verkeren omdat de oorzaak van de veranderingen in de stofwisseling niet op een eenvoudige manier is weg te nemen; zeker niet door opheffing van een tekort aan water of stikstof e.d.

18. Niet-natuurlijke omstandigheden

Tot dusver hebben we gesproken over het ontstaan van stress als gevolg van veranderingen in natuurlijke verhoudingen, waartoe ook inwerkingen van pathogenen kunnen worden gerekend. Heel actueel zijn veranderingen in de stofwisseling van een plant die door niet-natuurlijke oorzaken ontstaan (35). Ingrijpend is bijv. een luchtverontreiniging door SO_2 , dat de snelheid van de fotosynthese sterk reduceert en de verhouding tussen de stofwisselingssystemen beïnvloedt (Kropff, 1987). Ook nu weer zal er op de scheiding van wegen datgene gebeuren, waartoe het reactievermogen van de plant in staat is. Dit vermogen is echter beperkt; we zien dit al te duidelijk in de gevolgen van zure regen. Hoewel in dit geval aan meerdere stoffen, zoals ozon en stikstofdioxide wordt gedacht, is het denkbaar dat het afsterven van bomen mede veroorzaakt wordt door optredende waterstress. De ernstigste aantastingen komen voor op de zandgronden. In deze gronden wordt het regenwater niet of onvoldoende vastgehouden en verdwijnt snel. Bovendien doet de onttrekking van water aan de grond voor de drinkwatervoorziening van grote bevolkingscentra en voor de industriële activiteiten geen goed aan de waterhuishouding van de bomen. Een enkele regenbui zal lang niet altijd voldoende zijn; dit water verdampt weer snel of wordt door de heesters en kruidachtige gewassen snel opgenomen en de dieper gelegen wortels van de bomen trekken er nauwelijks profijt meer van. Inwendige verzuring in de organen van de bomen begint op te treden; een verzuring die bovendien door gassen die in de lucht niet thuishoren, wordt versterkt. Afgezien van

Proline en asparagine
in generatieve organen



toxische effecten, verkeren de bomen in nood omdat hier uit de betreffende stofwisselingssystemen onvoldoende stoffen beschikbaar komen om de overmaat waterstof-ionen weg te nemen.

19. Evenwicht tussen stofwisselingssystemen

Tussen de verschillende stofwisselingssystemen, waarvan de fotosynthese, de eiwitsynthese en de ademhaling zeer belangrijk zijn, bestaat een nauw verband. Er is a.h.w. een zeker evenwicht tussen deze systemen. In elk systeem vinden omzettingen van de ene stof in de andere plaats en zal een produkt van het ene naar het andere systeem worden geleid langs wegen waarvan er vele reeds bekend zijn. Een aanwijzing van hoe het met de verhouding tussen die systemen is gesteld, verkregen we uit de analyses van de gebeurtenissen die op de scheiding van die wegen optreden. Wat er in het onderzoek naar de mogelijkheden van optimale groei en produktie van planten kan worden gedaan, kan een fysiologische beschouwing over deze gebeurtenissen een belangrijke bijdrage leveren; zoals ook in de studie voor het ontwikkelen van groei- en produktiemodellen. Daar waar o.a. de waterhuishouding belangrijk is, kan inzicht in de samenhang van de verhouding tussen vrij tot gebonden water en de stofwisselingsactiviteit verhelderend zijn.

20. Het voortbestaan van planten

Het is opvallen, dat in het stuifmeel en in de vruchtbeginsels van bijvoorbeeld maïs en veldbonen zulke hoge prolineconcentraties worden gevonden (36) (Venekamp en Koot, 1984b en 1988). Bovendien bevatten stijlen ongewoon grote hoeveelheden asparagine. Eigen onderzoek leidde tot de conclusie dat in de generatieve organen van planten stofwisselingstypen voorkomen die ook onder normale omstandigheden veel gelijkenis vertonen met die in bladeren van planten die gebrek aan water en aan licht hebben. Deze typen zijn blijkbaar de middelen die een plant gebruikt om het voortbestaan te garanderen. Zo vormt een maïs-plant bij gebrek aan stikstof weliswaar minder zaden, maar deze hebben toch het normale stikstofgehalte (Venekamp et al., 1985). We funderen hier als het ware de biologische wet tot behoud van het leven. Deze houdt in dat de stofwisseling van een organisme die weg gaat waarbij het leven zo lang mogelijk wordt gehandhaafd. Van de zee tot de woestijn en tussen het licht en de duisternis vinden we planten die met de hier geschetste stofwisselingspatronen in staat zijn om te blijven voortbestaan.

Literatuur

Allen, S. & J.A. Raven, 1987.

Intracellular pH regulation in *Ricinus communis* grown with ammonium or nitrate as N source: The role of long distance transport. *Journal of Experimental Botany* 38, 580-596.

Avila, C., J.R. Botella, F.M. Canovas, J.N. de Castro & V. Valpuesta, 1987.

Different characteristics of the two glutamate synthases in the green leaves of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiology* 85, 1036-1039.

Begg, J.E. & N.C. Turner, 1976.

Crop water deficits. *Advances in Agronomy* 28, 161-207.

Botha, F.C. & P.J. Botha, 1979.

The effect of water stress on the nitrogen metabolism of two maize lines. II. Effects on the rate of protein synthesis and chlorophyll content. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 94, 179-183.

Boyer, J.S., 1969.

Measurements of the water status of plants. *Annual Review of Plant Physiology* 20, 351-364.

Caers, M., P. Rudelsheim, H. van Onckelen & S. Horemans, 1985.

Effect of heat stress on photosynthetic activity and chloroplast ultrastructure in correlation with endogenous cytokinin concentration in maize seedlings. *Plant and Cell Physiology* 26, 47-52.

Davies, D.D., 1986.

The fine control of cytosolic pH. *Physiologia Plantarum* 67, 702-706.

Dwivedi, S., M. Kar & D. Mishra, 1979.

Biochemical changes in excised leaves of *Oryza sativa* subjected to water stress. *Physiologia Plantarum* 45, 35-40.

Dwurazna, M.M. & M. Weintraub, 1969.

Respiration of tobacco leaves infected with different strains of potato virus X. *Canadian Journal of Botany* 47, 723-730.

Dwurazna, M.M. & M. Weintraub, 1969b.

The respiratory pathways of tobacco leaves infected with potato virus X. *Canadian Journal of Botany* 47, 731-736.

Dijkshoorn, W. & J.E.M. Lampe, 1980.

A plant test for sufficiency of phosphorus based on the phosphorus nitrogen interaction in sunflower nutrition. *Netherlands Journal of Agricultural Sciences* 28, 135-146.

Dijkshoorn, W., D.J. Lathwell & C.T. de Wit, 1968.

Temporal changes in carboxylate content of ryegrass with stepwise change in nutrition. *Plant and Soil* 29, 369-390.

Ellis, R.J., 1979.

The most abundant protein in the world. Trends in Biochemical Science 4, 241-244.

Farkas, G.L.; F. Solymosy & L. Lovrekovich, 1964.

The role of altered enzyme levels in the regulation of metabolic pattern in diseased plant tissues. Symposium Aschersleben DDR, 71-81.

Givan, C.V., 1979.

Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. Phytochemistry 18, 375-382.

Goyal, A., 1987.

Effect of water stress on glycolate metabolism in the leaves of rice seedlings (*Oryza sativa*). Physiologia Plantarum 69, 289-294.

Gupta, A.S. & G.A. Berkowitz, 1987.

Osmotic adjustment, symplast volume, and nonstomatically mediated water stress inhibition of photosynthesis in wheat. Plant Physiology 85, 1040-1047.

Hartmann, Th. & A. Ehmke, 1986.

Metabolism of organic N-compounds. Progress in Botany 48, 124-132.

Kemble, A.R. & H.T. MacPherson, 1954.

Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. Biochemical Journal 58, 46-49.

Kriedemann, P.E. & W.J.S. Downton, 1981.

Photosynthesis. In: L.G. Paleg & D. Aspinall (Eds.), The Physiology and Biochemistry of drought resistance in plants, Academic Press, Sydney, New York, London, Toronto and San Francisco, 283-314.

Kropff, M.J., 1987.

Physiological effects of sulphur dioxide. 1. The effect of SO₂ on photosynthesis and stomatal regulation of *Vicia faba* L. Plant, Cell and Environment 10, 753-760.

Kuyf, H.A. & K. de Voogd van der Straaten, 1984.

Het vergelijken van de invloed van stikstof-, fosfor-, licht-, water- en warmtegebrek op de gehalten aan bufferoplosbare-, membraangebonden- en residu-eiwitten en enkele vrije aminozuren in de bladeren van maïs. Stage-verslag, CABO.

Lawlor, D.W. & H. Fock, 1975.

Photosynthesis and photorespiratory CO₂ evolution of water-stressed sunflower leaves. Planta 126, 247-258.

Lawlor, D.W. & H. Fock, 1978.

Photosynthesis, respiration and carbon assimilation in water-stressed maize at two oxygen concentrations. Journal of Experimental Botany 29, 579-593.

Makino, A., T. Mae & K. Ohira, 1983.

Photosynthesis and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves. *Plant Physiology* 73, 1002-1007.

Nobel, P.S., 1974.

Introduction to biophysical plant physiology, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 44-90.

Penning de Vries, F.W.T., 1982.

Systems analysis and models of crop growth; crop production in relation to availability of nitrogen. In: F.W.T. Penning de Vries & H.H. van Laar (eds.), *Simulation of plant growth and crop production. Simulation Monographs*, Pudoc, Wageningen, The Netherlands, 9-17, 213-220.

Perdrizet, E., 1968.

Metabolisme glucidique et amine des plantes parasitées par les virus du type jaunisse. Comparaison avec d'autres processus de déficience chlorophyllienne. *Proceedings of the Conference of Polish Plant Virologists, Kraków*, 133-147.

Sadasivan, T.S., 1964.

Physiology of wilting plants. *Symposium Aschersleben D.D.R.*, 149-163.

Sanchez, R.A., A.J. Hall, N. Trapani & R. Cohen de Hunai, 1983.

Effects of water stress on the chlorophyll content, nitrogen level and photosynthesis of leaves of two maize genotypes. *Photosynthesis Research* 4, 35-47.

Singal, H.R., J.S. Sheoran & R. Singh, 1985.

Effect of water stress on photosynthesis and in vitro activities of the PCR cycle enzymes in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynthesis Research* 7, 69-76.

Subramanian, C.V., 1964.

Host-pathogen interaction in foot rot of wheat. *Symposium Aschersleben D.D.R.*, 133-148.

Tikhomirova, E.V., 1985.

Changes of nitrogen metabolism in millet at elevated temperatures. *Field Crops Research* 11, 259-264.

Uritani, J., 1964.

Molecular pathology in the plant field with special regard to defense action of the host. *Symposium Aschersleben D.D.R.*, 201-218.

Venekamp, J.H., 1955.

The metabolism of amides and amino acids in etiolated seedlings of *Lupinus luteus* L. *Acta Botanica Neerlandica* 4, 487-550.

Venekamp, J.H., 1959.

De invloed van enige virussen op de concentraties van organische zuren in een aantal planten (with a summary: The influence of some viruses on the concentrations of organic acids in a number of plants). Tijdschrift over Plantenziekten 65, 177-187.

Venekamp, J.H. & A.B.R. Beemster, 1980a.

Mature plant resistance of potato against some virus diseases. I. Concurrence of development of mature plant resistance against potato virus X, and decrease of ribosome and RNA content. Netherlands Journal of Plant Pathology 86, 1-10.

Venekamp, J.H. & A.B.R. Beemster, 1980b.

Mature plant resistance of potato against some virus diseases. II. Mature plant resistance and the influence of temperature on the ribosome and RNA content in leaves. Netherlands Journal of Plant Pathology 86, 11-16.

Venekamp, J.H., A. Schepers & C.B. Bus, 1980.

Mature plant resistance of potato against some virus diseases. III. Mature plant resistance against potato virus Y^N, indicated by decrease in ribosome-content in ageing potato plants under field conditions. Netherlands Journal of Plant Pathology 86, 301-309.

Venekamp, J.H. & J.T.M. Koot, 1984a.

A study on the redistribution of protein-nitrogen in field bean plants, *Vicia faba* L. Journal of Agronomy and Crop Science 153, 225-233.

Venekamp, J.H. & J.T.M. Koot, 1984b.

The distribution of free amino acids, especially of proline, in the organs of field bean plants, *Vicia faba* L., during development in the field. Journal of Plant Physiology 116, 343-349.

Venekamp, J.H., F.W.T. Penning de Vries & J.T.M. Koot, 1985.

Influence of different levels of nitrogen on nitrogen nutrition and metabolism of maize plants, *Zea mays* L. Journal of Agronomy and Crop Science 155, 217-226.

Venekamp, J.H., F.W.T. Penning de Vries & J.T.M. Koot, 1986.

Phosphorus redistribution in maize plants, *Zea mays* L., in relation to the nitrogen supply, Journal of Agronomy and Crop Science 157, 208-214.

Venekamp, J.H., C. Grashoff & J.T.M. Koot, 1987a.

An analysis of conditions determining decline in water potential and concurrent proline accumulation in leaves of four cultivars of *Vicia faba* L. Journal of Agronomy and Crop Science 158, 304-316.

- Venekamp, J.H., F.W.T. Penning de Vries, H. Mensink, F. van Mourik & J.T.M. Koot, 1987b.
The effect of alterations in nitrogen supply on nitrogen metabolism of hydroponically grown maize plants, *Zea mays* L. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 182, 349-358.
- Venekamp, J.H. & J.T.M. Koot, 1988.
The sources of free proline and asparagine in field bean plants, *Vicia faba* L., during and after a short period of water withholding. *Journal of Plant Physiology* 132, 102-109.
- Venekamp, J.H. & J.T.M. Koot, 1988.
Alterations of free amide and amino acid contents during the development of maize plants, *Zea mays* L., in preparation.
- Venekamp, J.H., J.E.M. Lampe & J.T.M. Koot, 1988.
Organic acids as sources for drought-induced proline synthesis in field bean plants, *Vicia faba* L., in preparation.
- Vertucci, C.W. & A.C. Leopold, 1987.
The relationship between water binding and desiccation tolerance in tissues. *Plant Physiology* 85, 232-238.
- Vos, J., 1986.
Research on water relations and stomatal conductance in potatoes. 1. An introduction to concepts, techniques and procedures. In: A.G.B. Beekman et al., (Eds.), *Potato Research of Tomorrow: drought tolerance, virus resistance and analytic breeding methods*, Pudoc, Wageningen, 17-28.
- Vu, J.C.V., L.H. Allen Jr. & G. Bowes, 1987.
Drought stress and elevated CO₂ effects on soybean ribulose biphosphate carboxylase activity and canopy photosynthetic rates. *Plant Physiology* 83, 573-578.
- Yamaguchi, A. & T. Takahashi, 1964.
The effect of systemic virus infection on the respiration of leaves. *Symposium Aschersleben, D.D.R.*, 99-109.
- Yamaya, T., A. Oaks, D. Rhodes & H. Matsumoto, 1986.
Synthesis of [¹⁵N] glutamate from [¹⁵N]H₄⁺ and [¹⁵N] glycine by mitochondria isolated from pea and corn shoots. *Plant Physiology* 81, 754-757.
- Yamaya, T. & A. Oaks, 1987.
Synthesis of glutamate by mitochondria, an anaplerotic function for glutamate dehydrogenase. *Physiologia Plantarum* 70, 749-756.
- Yamaya, T. & A. Oaks, 1988.
Distribution of two isoforms of glutamine synthetase in bundle sheath and mesophyll cells of corn leaves. *Physiologia Plantarum* 72, 23-28.